

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/014433 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 48/00, 35/76, A61P 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010143

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 8 日 (08.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-232086 2002 年 8 月 8 日 (08.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND  
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉  
県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小澤 滯司

(OZAWA, Seiji) [JP/JP]; 〒371-0033 群馬県 前橋市 国  
領町 2-2 2-1 3-1 0 3 Gunma (JP). 石内 勝吾  
(ISHIUCHI, Shogo) [JP/JP]; 〒371-0844 群馬県 前橋市  
古市町 1-1 3-7 Gunma (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052  
東京都港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo  
(JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

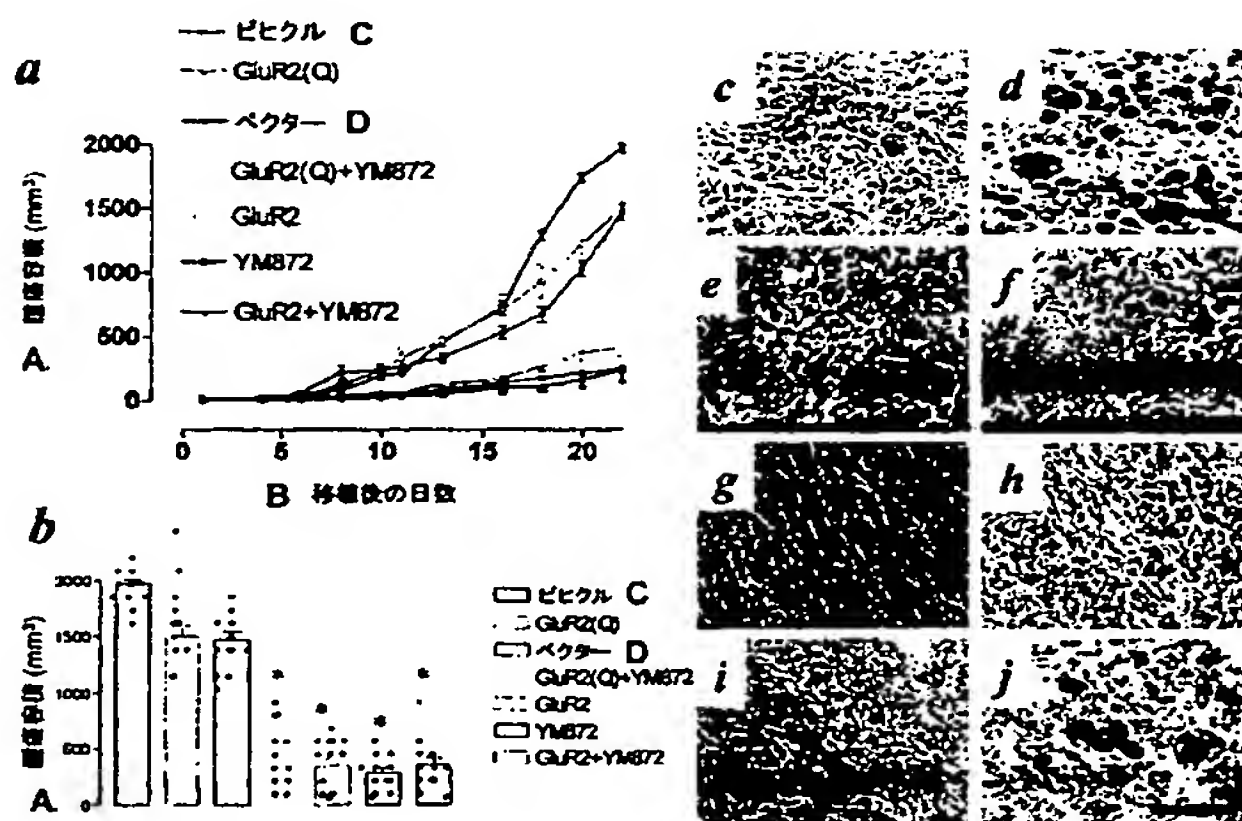
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INHIBITION OF PROLIFERATION AND INFILTRATION OF BRAIN TUMOR CELLS CAUSED BY EXPRESSION  
OF AMPA-TYPE GLUTAMATE RECEPTOR SUBUNIT

(54) 発明の名称: AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの発現による脳腫瘍細胞の増殖と浸潤の抑制



A...TUMOR VOLUME (mm<sup>3</sup>)  
B...TIME (DAYS) AFTER  
TRANSPLANTATION  
C...VEHICLE  
D...VECTOR

(57) Abstract: It is intended to provide a therapeutic method of inhibiting the proliferation and infiltration of brain tumor cells in animal brain tumor cells and a method of measuring the proliferation/infiltration activity of the brain tumor cells, preferably glioblastomas. In animal brain tumor cells, the proliferation and infiltration of the brain tumor cells are inhibited by regulating the Ca<sup>2+</sup> permeability by a glutamate receptor subunit. The Ca<sup>2+</sup> permeability by the glutamate receptor subunit can be regulated by transferring an R2 gene into an AMPA-type glutamate receptor subunit Glu. A method of measuring the proliferation/infiltration activity of the brain tumor cells which comprises detecting and measuring the expression of the glutamate receptor subunit in animal brain tumor cells.

/続葉有/

Best Available Copy



---

(57) 要約:

動物の発症する脳腫瘍細胞において、脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する治療方法を提供すること、及び該脳腫瘍細胞好ましくは神経膠芽腫において、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定する方法を提供するものである。動物の発症する脳腫瘍細胞において、グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する。グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御するには、脳腫瘍細胞に、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を導入することにより、行うことができる。更に、本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞のグルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することによって、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定する方法を提供する。

## 明 細 書

A M P A型グルタミン酸受容体サブユニットの発現による脳腫瘍細胞の増殖と浸潤の抑制

5

## 技術分野

本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞において、 $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法、特に、A M P A型グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法、及び動物の発症する脳腫瘍細胞において、グルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することによって、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定する方法に関する。

## 15 背景技術

グルタミン酸は、高等動物の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、グルタミン酸の受容体であるグルタミン酸受容体は中枢神経における興奮性シナプス伝達の中心的役割を担っている。更に、グルタミン酸受容体は、記憶、学習の細胞レベルにおける基盤と考えられているシナプス可塑性や、発達期のシナプス可塑性すなわち経験依存的な神経回路網の形成に関与していることが知られている。また、虚血など病的条件下における神経細胞死にも関与していることが示唆されている。

グルタミン酸受容体はその構造とシグナル伝達機構から、イオンチャンネルを内蔵して速いシナプス伝達を担うイオンチャンネル型グルタミン酸受容体と、Gタンパク質と共役することにより間接的にシグナルを

伝える代謝型グルタミン酸受容体とに大別される。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸の結合により自身の陽イオンチャンネルを開口する受容体－イオンチャンネル複合体であり、高等動物の中枢神経系（CNS）における速い興奮性シナプス伝達を担っている。

5     イオンチャンネル型受容体は、特異的アゴニストやアンタゴニストに対する反応性と内蔵するイオンチャンネルの電気生理学的特性により、N－メチル－D－アスパラギン酸（NMDA：N-methyl-D-aspartic acid）に感受性のNMDA受容体と非感受性の非NMDA受容体到大別される。アゴニストが結合すると $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ に加えて $\text{Ca}^{2+}$ を通過させる。  
10    非NMDA受容体は、カイニン酸、AMPA（ $\alpha$ －アミノ－3－ヒドロキシ－5－メチル－4－イソオキサゾールプロピオン酸： $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid）に対する感受性の差により、カイニン酸受容体、AMPA受容体のサブタイプに分類され、アゴニストが結合すると $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ を通過させる。

15    AMPA型グルタミン酸受容体（AMPA R）は、中枢神経系（CNS）中のほとんどすべての興奮性シナプスにおける迅速な神経伝達を仲介している（Trends Neurosci., 16, 359-365, 1993; Annu. Rev. Neurosci., 17, 31-108, 1994, Prog. Neurobiol., 54, 581-618, 1998）。従来、該受容体は神経細胞にのみ存在すると考えられてきたが、最近、大半のグリア細胞（glial cell）中でも発現していることが明らかとなった  
20    （Trends Pharmacol. Sci., 21, 252-258, 2000）。

AMPA受容体（AMPA R）は、GluR1～GluR4という4つのタンパク質から選択されるサブユニットから構成されていることが知られている。そして、AMPA Rの $\text{Ca}^{2+}$ 透過性は、そのサブユニットの組成によって決まる。  
25    

GluR2サブユニットをもつ受容体は、 $\text{Ca}^{2+}$ に対してほとんど透

過性を示さないが、G 1 u R 2 をもたない受容体は、高い  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を示す。G 1 u R 2 サブユニットが豊富に存在すると、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性が低下する (Trends Neurosci., 16, 359-365, 1993; Annu. Rev. Neurosci., 17, 31-108, 1994; Prog. Neurobiol., 54, 581-618, 1998)。この G 1 u R 2 の固有の性質は、第 2 番目の疎水性領域 (M 2) にある 1 つのアミノ酸残基に起因する。このアミノ酸残基は、G 1 u R 2 中ではアルギニン (R) であるが、他のサブユニットの相当する部位はグルタミン (Q) が占めている。この重要な部位 (Q/R 部位) のアルギニンがグルタミンに置換されると、変異した G 1 u R 2 (Q) から集まった相同的な受容体は高い  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を示す。

生体中において、AMPA 受容体 (AMPA R) のサブユニットのうち、G 1 u R 2 の疎水性領域 (M 2) にある 1 つのアミノ酸残基がアルギニン (R) となるメカニズムは、遺伝子の転写後に起こる「RNA 編集 (RNA editing)」という現象で知られている。すなわち、遺伝子 (DNA) が mRNA に転写された後に 1 塩基が置換され、その結果、タンパク質レベルでも 1 アミノ酸残基の置換が生じる。遺伝子では、グルタミン酸 (Q) がコードされているのに対して、実際にはアルギニン (R) に置き換っているという特異な現象である。しかしながら、この変換によって、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性が低下する。

上記のように、グルタミン酸受容体は神経伝達物質受容体として機能しているので、これまでは主に精神的疾患、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や、記憶・学習の分野を中心に盛んに研究されてきており、種々の知見や、治療薬等の開発が行われてきた。それらの研究・開発の成果として、例えば、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、脳卒中又はてんかんなどの神経変性疾患に関与する遺伝子を同定するための方法、及び神経変性疾患を有す



る動物を治療するための治療薬などの開発が行われてきた。

一方で、脳腫瘍として、神経膠芽腫 (glioblastoma)、乏突起膠腫 (oligodendroglioma) 髄膜腫 (meningioma) などが良く知られている。特に、神経膠芽腫 (glioblastoma) は、中枢神経系 (CNS) で最もよく見受けられ、かつ最も悪性の腫瘍である。この種の腫瘍は、遊走性及び浸潤性が高いことで知られている (Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous Systems, 29-39, 2000 (IARC press, Lyon, France))。遊走細胞は、密集した有髄の経路に沿って優先的な動きを示し、CNS 中に広範囲に広がっていくため (Neurol. Med. Chir., 34, 91-94, 1994, Neurol. Med. Chir., 33, 425-428, 1993, Neuropathology, 17, 186-188, 1997)、外科的な処置を施しても好結果が得られていない。

また、悪性神経膠腫 (glioma) の二大特徴である細胞の増殖及び遊走は、神経膠腫の起源となる細胞の神経前駆細胞にも認められる (Glial Cell Development, 209-220, 1996 (BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.), Glia, 15, 222-230, 1995)。神経膠腫細胞は、神経伝達物質、ホルモン、及び成長因子 (Trends Pharmacol. Sci., 21, 252-258, 2000) などの各種外部刺激に反応するため、神経膠芽腫の悪性の特徴は表面受容体の活性化を通じて、少なくとも部分的に制御することができる。

近年、グルタミン酸受容体が、神経前駆細胞だけではなく神経膠腫においても発現することが報告されている (J. Neurosci., 17, 227-240, 1997, Glia, 10, 149-153, 1994, J. Neurosci., 16, 519-530, 1996, Eur. J. Neurosci., 10, 2153-2162, 1998, J. Neurosci. Res., 46, 164-178, 1996)。しかし、その病理生理学的重要性は、大部分が不明のままである。

本発明の課題は、動物の発症する脳腫瘍細胞において、 $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法、特には、

AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法を提供すること、更には動物の発症する脳腫瘍細胞において、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することによって、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定する方法を提供することにある。

本発明者は、確立した脳細胞の培養系を用い、カルシウム透過型AMPA受容体のグリア細胞における役割について解析する中で、強いカルシウム透過性を有するGluR2 (Q) 遺伝子を強制発現させると細胞の突起形成が促進され、逆にカルシウム非透過性を有するGluR2 (GluR2 (R)) 遺伝子を導入すると、突起の退縮と細胞の扁平化が生じることを見出し、報告した (NeuroReport 12(2001), 745-748)。

そして、本発明者は、AMPA R (AMPA受容体) がヒト神経膠腫細胞で発現しており、更にGluR2 (Q) 遺伝子を強制発現させた紡錘形細胞は、培養フラスコ内で重層しながら遊走するグリオーマ細胞や、摘出標本でしばしば認められる白質髄鞘線維内を走行する腫瘍細胞と形態学的に良く似ていることから、カルシウム透過型AMPA Rが腫瘍細胞の浸潤性に関与しているのではないかと推測し、更に、解析を進めた結果、(1) GluR1及び／又はGluR4サブユニットが、ヒト神経膠芽腫細胞のいたるところで発現しており、 $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rとして作用していること、(2) 該神経膠芽腫細胞に、GluR2 (GluR2 (R)) 遺伝子を導入し、こうした内在性 $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rを、 $Ca^{2+}$ 非透過性AMPA Rに変換すると、腫瘍細胞中で遊走が阻害され、アポトーシスが、誘導されること、及び(3) これに対して、 $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rが過剰発現すると、腫瘍細胞の増殖だけでなく遊走行動も増大すること、を見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明においては、動物の発症する脳腫瘍細胞において、

グルタミン酸受容体サブユニットによる  $Ca^{2+}$  透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制することよりなる。グルタミン酸受容体サブユニットによる  $Ca^{2+}$  透過性を制御するには、脳腫瘍細胞に、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の遺伝子を導入  
5 することにより、行うことができる。更に、本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞において、グルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することによって、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定する方法を提供する。

## 10 発明の開示

すなわち本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞において発現するAMPA型グルタミン酸受容体サブユニットによる  $Ca^{2+}$  透過性を制御することにより、脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法（請求項1）や、グルタミン酸受容体サブユニットによる  $Ca^{2+}$  透過性の制御を、動物の  
15 発症する脳腫瘍細胞に、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の遺伝子を導入し、発現させることにより行うことを特徴とする請求項1記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法（請求項2）や、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の遺伝子が、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の cDNA である  
20 ことを特徴とする請求項2記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法（請求項3）や、動物の発症する脳腫瘍細胞に、発現ベクターを用いて、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の遺伝子を導入し、発現させることを特徴とする請求項2又は3記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法（請求項4）や、発現ベクターが、アデ  
25 ノウィルスを用いたベクターであることを特徴とする請求項4記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法（請求項5）や、脳腫瘍細胞が、



神経膠芽腫細胞であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法（請求項 6）からなる。

また本発明は、AMP A 型グルタミン酸受容体サブユニット G l u R 2 の遺伝子を、脳腫瘍細胞への遺伝子導入・発現用ベクターに組み込んだことを特徴とする脳腫瘍治療用遺伝子発現ベクター（請求項 7）や、発現ベクターが、アデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 7 記載の脳腫瘍治療用遺伝子発現ベクター（請求項 8）や、請求項 7 又は 8 記載の脳腫瘍治療用遺伝子発現ベクターをセットしたことを特徴とする脳腫瘍治療用遺伝子導入用キット（請求項 9）からなる。

さらに本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞における AMP A 型グルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することを特徴とする脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性の測定方法（請求項 10）や、グルタミン酸受容体サブユニットの発現の検出・測定が、AMP A 型グルタミン酸受容体サブユニット G l u R 2 の検出・測定であることを特徴とする請求項 10 記載の脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性の測定方法（請求項 11）からなる。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明において、ヒト神経膠芽腫細胞における AMP A 受容体の発現を示す写真である。

第 2 図は、本発明において、培養腫瘍細胞における、AMP A が誘導した  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を示す写真である。

第 3 図は、本発明において、アデノウイルスが介する AMP A 受容体サブユニットの発現の作用を示す写真である。

第 4 図は、本発明において、G l u R 2 及び G l u R 2 (Q) の発現が細胞の遊走に及ぼす作用を示す図である。

第5図は、本発明において、GluR2の発現が、腫瘍移植に及ぼす作用を示す写真である。

第6図は、本発明において、AMPA受容体の操作が腫瘍の成長に及ぼす作用を示す図である。

5

発明を実施するための最良の形態

本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞において、発現するグルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより、脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制することよりなる。動物の発症する脳腫瘍細胞としては、神経膠芽腫 (glioblastoma)、乏突起膠腫 (oligodendroglioma) 髄膜腫 (meningioma) などが挙げられる。グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性の制御には、動物の発症する脳腫瘍細胞に、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を導入し、発現させることにより行うことができる。該AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子としては、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2のcDNAを用いることができるが、該遺伝子は既に公知のものであり (Science 249, 1580-1585, 1990)、該遺伝子の塩基配列は、GenBankデータベースにより、アクセッション・ナンバー：M38061として検索することができる。

本発明において、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を、動物の発症する脳腫瘍細胞に導入するには、適宜の公知の遺伝子導入手段を用いることができる。その導入手段の好ましい方法としては、アデノウイルス発現用ベクターを用いることができる。そのようなアデノウイルス発現用ベクターとしては、一過性発現に用いられているアデノウイルスベクター (Science, 259, 988-990, 1993) が挙

- げられる。アデノウイルスベクターは、中枢神経系（CNS）のグリア細胞に対して、極めて高い親和性を持ち、小脳皮質に注入した場合は、選択的にベルクマングリアにGluR2の遺伝子を発現させることが可能である。また、アデノウイルスベクターに、Cre/loxP発現制御システムを使用した遺伝子導入ベクター（Nucl. Acids Res., 23, 3816-3821, 1995）を用いることもできる。Cre/loxPシステムを用いる理由の一つに、AxCALNLGluR2のみの感染では、Creが存在しないためGluR2が発現しない状態をつくり出せることを利用して、それをウイルス感染による影響を除外するためのコントロールとして使用できるというメリットがある。

本発明においては、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を、アデノウイルスベクターのような遺伝子発現用ベクターに組み込んで、脳腫瘍治療用遺伝子導入キットとして用意し、これを脳腫瘍の治療に用いることができる。

- 本発明の他の実施の態様として、本発明の方法により、動物の発症する脳腫瘍細胞におけるグルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することにより脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定することが可能である。中枢神経系（CNS）における神経膠芽腫のような脳腫瘍においてはGluR1～4の4つのタンパク質からなるサブユニットが発現しており、その発現しているサブユニットの組成によって、細胞のCa<sup>2+</sup>透過性及び非透過性が決定される。そして、この細胞のCa<sup>2+</sup>透過性及び非透過性によって、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性が相違してくる。サブユニットGluR1やGluR4が発現していると、細胞はCa<sup>2+</sup>透過性となり、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤が促進され、サブユニットGluR2が発現すると、細胞はCa<sup>2+</sup>非透過性となり、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤が抑制される。

したがって、脳腫瘍細胞に発現するグルタミン酸受容体サブユニットを検出・測定することによって、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定することができる。グルタミン酸受容体サブユニットの検出・測定には、適宜公知の検出・測定手段を用いることができる。サブユニットの遺伝子の測定には、それぞれのサブユニットの遺伝子の検出のためのプローブを用いることができる。また、サブユニットの発現の検出・測定には、それぞれのサブユニットに特異的に結合する抗体を作製し、用いるのが好ましい。グルタミン酸受容体サブユニットに特異的に結合する抗体としては、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれもが使用  
5  
10  
15  
20  
25

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[グルタミン酸受容体サブユニットの発現、サブユニット G 1 u R 2 の導入及び腫瘍細胞の増殖と浸潤]

(神経膠芽腫の外科的試料及び細胞培養物における G 1 u R の発現)

本発明者は、外科的試料の in situ ハイブリダイゼーション研究における AMPAR サブユニット G 1 u R 1 の発現について調べた (第 1 図参照)。第 1 図の a は、神経膠芽腫の外科的試料の代表的な組織構造を示しており、浸潤性の腫瘍細胞が認められる。G 1 u R 1 のアンチセンスリボプローブでハイブリダイズしたシグナルを、遊走し増殖している未分化細胞中で検出した (第 1 図 b)。連続切片では、アフィニティー精製した G 1 u R 1 抗体で免疫染色した G 1 u R 1 タンパク質の発現が、腫瘍細胞中で検出された (第 1 図 c)。

さらに本発明者らは、G 1 u R 1、G 1 u R 2、G 1 u R 2 / 3、及び G 1 u R 4 に対する抗体を選択して免疫組織化学的染色を行うことに

より、パラフィン包埋した神経膠芽腫の外科的試料 ( $n = 16$ ) 中の AMPAR サブユニットの発現について調べた (表 1)。調べた外科的試料 ( $n = 16$ ) のすべてに、GluR1 タンパク質の発現が認められた。これらの試料では、腫瘍細胞の大半 ( $52 \pm 21\%$ ,  $n = 16$ ) に、GluR1 タンパク質が発現していた。16 個の神経膠芽腫の外科的試料のうち 14 個で、少数の細胞 ( $21 \pm 7\%$ ,  $n = 14$ ) に GluR2 の発現が観察された。抗 GluR2 / 3 抗体による染色を 16 個の外科的試料のうち 14 個 ( $31 \pm 5\%$ ,  $n = 14$ ) で観察した。すべての外科的試料 ( $55 \pm 7\%$ ,  $n = 16$ ) で、腫瘍細胞は GluR4 にも陽性を示していた。

図 1 d から g は、GluR1、GluR2、及び GluR4 に対する抗体で処理した外科的試料原本の連続切片の一例を示す。これらの切片では、遊走する神経膠芽腫細胞が脳皮質の軟膜下に広範囲に蓄積していた。これらの細胞は GluR1 と GluR4 の両方を発現していたが、GluR2 の発現はごくわずかなものだった (第 1 図 d、e、f 及び g)。隣接する脳組織 (第 1 図 h、i、j 及び k) では、浸潤性の未分化腫瘍細胞が GluR1 と GluR4 を発現していた (第 1 図 i 及び k) のに対し、正常なニューロンは GluR2 を大量に発現していた (第 1 図 j)。白質に浸潤していた紡錘状の腫瘍細胞は、未成熟の星状細胞のマーカーであるビメンチンと GluR1 を発現していたが、GluR2 の発現はごくわずかなものだった。

本発明者は、外科的試料から神経膠芽腫細胞の一次培養細胞を調製し、AMPAR サブユニットの発現について調べた (表 1)。これらの培養細胞では、大半の細胞が GFAP 免疫応答性を示していた。このことから、それらがグリア細胞に由来するものであり、ニューロンのマーカーであるニューロフィラメントタンパク質 (NFP) (Nature, 298, 277-279,



1982, Acta Neuropathol., 64, 30-36, 1984)、及びミクログリアのマーカーであるK i -M 1 P (Pathol. Int., 46, 15-23, 1996) それぞれに対する免疫応答性の欠如からわかるとおり、ニューロンやミクログリアによって汚染されていないことがわかる。

- 5      G 1 u R 1 及び G 1 u R 4 に対する抗体を用いた二重免疫蛍光法においては、大半の培養細胞は、両方のタンパク質を同時に発現していた(第1図 l、m、及び n)。しかし、G 1 u R 1 及び G 1 u R 2 又は G 1 u R 4 及び G 1 u R 2 に対する抗体を用いた二重免疫蛍光法においては、ほんの少数の G 1 u R 1 発現細胞又は G 1 u R 4 発現細胞が、G 1 u R 2  
10    免疫応答性を示すにとどまっていた(第1図 o、p、及び q)。

本発明者らは外科的試料から4つの神経膠芽腫細胞株を確立した。そのうち3つは、G 1 u R 1 と G 1 u R 4、G 1 u R 1 と G 1 u R 3、G 1 u R 3 と G 1 u R 4 をそれぞれ発現していた。1つの細胞株は、A M P A R サブユニットを全く発現していなかった。市販のヒト神経膠芽腫  
15    細胞株である U 8 7    M G についても、A M P A R サブユニットの発現を調べてみた。この細胞株では G 1 u R 1 と G 1 u R 3 の発現が強く、G 1 u R 2 の発現は弱かった(表1)。

神経膠芽腫細胞での G 1 u R 1 ~ 4 サブユニットの発現を確認するため、本発明者らは次に逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(R T - P C R) 研究を行った(Neuron, 12, 383-388, 1994)。3つの外科的試料、4つの  
20    一次培養細胞、及び5つの細胞株について、逆転写を行い、ついで G 1 u R 1 ~ 4 に特異的なプライマーを用いて、P C R 増幅を行った。各 G 1 u R 1 ~ 4 断片に特異的な酵素を用いた制限酵素分析で、増幅産物を調べた(Neuron, 12, 383-388, 1994)。第1図 r は、腫瘍細胞の一次培  
25    養で得られた代表的な結果を示す。この事例では、すべての G 1 u R 1 ~ 4    m R N A の発現が検出されている。コントロールである腫瘍に隣

接した脳組織でも、GluR1～4 mRNAの発現が検出された（第1図s）。GluR1～4 mRNAの発現に関しては、RT-PCRで得た結果は、免疫組織化学法により得た結果と完全に一致している（表1）。

5

（表1）

	免疫組織化学法				RT-PCR			
	R1	R2	R2/R3	R4	R1 R	2	R3	R4
<b>外科的試料</b>								
GNS-3000	+++	+	+	++				
GNS-3114	++	++	++	+++	+	+	+	+
GNS-3148	++	+/-	+/-	++				
GNS-3186	++	+	+	++				
GNS-3195	++	+	+	++				
GNS-3199	++	+	+	++				
GNS-3210	+++	+	+	+++				
GNS-3226	++	+	+	++				
GNS-3243	++	++	++	+++				
GNS-3245	++	+	+	++	+	+	+	+
GNS-3262	++	+	+	++				
GNS-3275	++	+	+	++				
GNS-3296	++	+	+	++				
GNS-3314	+++	+	+	+++	+	+	+	+
G-22	+	-	-	+				
G-87535	++	-	-	+				
<b>培養細胞</b>								
GNS-3245	+++	-	+	+	+	-	+	+
GNS-3296	++	+	+	++	+	+	+	+
GNS-3302	+++	+	+	+++	+	+	+	+
GNS-3314	+++	++	++	+++	+	+	+	+
<b>細胞株</b>								
CGNH-89	++	-	-	++	+	-	-	+
CGNH-NM	++	-	+	-	+	-	+	-
MRCH-92	-	-	+	+	-	-	+	+
TATE-87	-	-	-	-	-	-	-	-
U87 MG	+++	+	++	-	+	+	+	-

これらの結果から、AMPA Rサブユニットがヒト神経膠芽腫細胞で発現すること、及び、GluR1とGluR4サブユニットがGluR2サブユニットよりも大量に、しかも安定的に発現していることがわかる。これらの結果は、GluR2を除外して集められた $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rがこれらの細胞中で形成することを強く示唆している。

(神経膠芽腫細胞における $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rの機能的発現)

一次培養物中の神経膠芽腫細胞における $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rの機能的発現を調べるためfura-2AMを使用してAMPAが誘導する細胞内 $[Ca^{2+}]_i$  ( $Ca^{2+}$ 濃度) の変化を測定した (第2図参照)。AMPA Rの脱感作を弱める、200  $\mu$ MのAMPAと100  $\mu$ Mのサイクロサイアザイド (CTZ) の投与により、培養細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が増大した (第2図a、b及びc)。80  $\pm$  21から285  $\pm$  120 nM (n = 150) への $[Ca^{2+}]_i$ の増大は、16個の個別培養皿の細胞中、65  $\pm$  15 %の細胞で検出された。 $[Ca^{2+}]_i$ の急増は、移植片の周縁部に位置する長い突起を持つ細胞において時折認められた (第2図d、e及びf)。

$[Ca^{2+}]_i$ の増大は、AMPAのアンタゴニスト、20  $\mu$ Mの2, 3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾ (F) -キノキサリン (NBQX) 又は10  $\mu$ Mの[2, 3-ジオキソ-7-(1H-イミダゾール-1-イル)-6-ニトロ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノキサリン-1-イル]酢酸一水和物 (YM872) のいずれかにより、選択的に消滅した (J. Pharm. Pharmacol., 50, 795-801, 1998)。これら培養細胞において、100 mMの $K^+$ が $[Ca^{2+}]_i$ を増大させることはなかった。このことは、電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルがこの $[Ca^{2+}]_i$ の増大に関与していないことを示している。ピメンチンとGluR1の発現は、 $[Ca^{2+}]_i$ 測定用に使われた一次培養細胞において、ともに

検出された（第2図g、h及びi）。

（アデノウィルスが仲介するAMPA Rサブユニットの発現の作用）

神経膠芽腫細胞における $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rの病態生理学的意義を明らかにするため、本発明者は、まず、アデノウィルスを介したGluR2 cDNAの導入によって $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rを $Ca^{2+}$ 非透過性受容体に変換することを試みた（Science, 292, 926-929, 2001、NeuroReport, 12, 745-748, 2001）。以下の実験を、主に確立した神経膠芽腫細胞株で行った（第3図）。かかる細胞株はCGNH-89と称し、GluR1及び／又はGluR4サブユニットからなる $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rを保有していた。

GluR2 cDNAを培養細胞に導入するため、本発明者は2つの組換えアデノウィルスを作製した。一方はCreリコンビナーゼ発現用の組換えアデノウィルス（AxCANCre）であり、他方はCAGプロモーター、一对のloxP配列、スタッファー遺伝子及びGluR2 cDNAからなり、CreによりGluR2の発現を制御するための切替装置を有するGluR2発現用組換えアデノウィルス（AxCALNLGluR2）である。また、アデノウィルス感染細胞のマーカーとして使用されるグリーン蛍光タンパク質（GFP）cDNAを有する組換えアデノウィルス（AxCAGFP）も作製した。第3図のaでは、GluR1タンパク質を発現する培養細胞（第3図b）がAxCAGFPに感染していた。GluR1を発現する細胞の大半で、感染の2日後にGFPの蛍光が検出された（第3図c）。また、細胞をAxCANCre、AxCALNLGluR2、AxCAGFPの3種類の組換えアデノウィルスで感染させると、GFPの蛍光を発するほとんどすべての細胞で、感染2日後にGluR2タンパク質が検出された（第3図d、e及びf）。

この結果、本発明者らはGluR2を発現する細胞の形態が著しく変

- 化することに気付いた（第3図d、e及びf）。細胞体は徐々に膨化し、扁平になり、細胞質の突起はウィルス感染後4日以内に退縮した。こうした特徴的な変化は、G1uR2の発現が誘導されることのないAxCALNLG1uR2及び／又はAxCAGFPを細胞に感染させた場合には決して見られないものであった。細胞体表面積の平均値は、AxCALNLG1uR2及び／又はAxCAGFPを感染させたコントロール細胞では $360 \pm 133 \mu\text{m}^2$ （ $n=30$ ）だったのに対し、G1uR2を発現する細胞では $1230 \pm 350 \mu\text{m}^2$ （ $n=30$ ）に増えていた（ $P<0.05$ ）。
- 10      また、本発明者らはG1uR2（R）発現細胞の細胞骨格が崩壊していること（第3図gのコントロール細胞に対する第3図hのG1uR2（R）発現細胞）、及び、核における泡状突起の出現やアポトーシス小体の形成といった、細胞がアポトーシスの徴候を示していることに気がついた第3図i）。こうした特徴的な変化は、G1uR1又はG1uR2
- 15      （Q）cDNAのいずれかが導入され、 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性AMPA Rが過剰発現した場合には、決して起こらないものであった。そのかわり、これらは、長い突起を有していることの多い、膨化した紡錘状細胞が高密度に増殖しているという、 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性AMPA Rを過剰発現する細胞培養物に共通の特色に、本発明者らは着目した（第3図j、k及びl）。
- 20      アデノウィルスを介したG1uR2（R）及びG1uR2（Q）の発現が誘導した、CGNH-89細胞における上記の変化は、U87 MG細胞でも見られた。G1uR2（R）遺伝子が導入されると、U87 MG細胞の細胞体が膨化し、扁平になった。これに対し、G1uR2（Q）遺伝子が導入された場合は、長い突起を有する紡錘状細胞の数が増大した（第3図m、n及びo）。
- 25

第3図p～xにおいて、本発明者らは、アデノウィルスを介したG1



u R 2 (R) 又は G 1 u R 2 (Q) の導入が誘導した、C G N H - 8 9 細胞における  $C a^{2+}$  透過性の変化を確認した。200  $\mu$  M の A M P A と 100  $\mu$  M の C T Z の投与により、10 個の培養皿中の  $52 \pm 14\%$  のコントロール細胞で、 $[C a^{2+}]_i$  が  $97 \pm 21$  から  $275 \pm 50$  nM ( $n = 350$ ) に増大した (第3図 p、q 及び r)。これと同じ処理を行っても、4 個の培養皿中の G 1 u R 2 発現細胞 (第3図 s、t 及び u) では  $[C a^{2+}]_i$  に何の作用も及ぼさなかったが、2 個の培養皿中の G 1 u R 2 (Q) 発現細胞 (第3図 v、w 及び x) では  $[C a^{2+}]_i$  が  $77 \pm 21$  から  $1185 \pm 240$  nM ( $n = 40$ ) に著しく増大した。

10 本発明者らは、G 1 u R 2 (R) を発現する C G N H - 8 9 細胞が、グリア細胞中で  $C a^{2+}$  シグナル伝達を仲介することがわかっている A T P に応答して、 $[C a^{2+}]_i$  をコントロール細胞と同程度にまで増大させるかどうかについても調べた (J. Neurosci., 18, 8794-8804, 1998)。

15 25  $\mu$  M の A T P の投与により、5 個の培養皿中の G 1 u R 2 (R) 発現細胞では  $[C a^{2+}]_i$  が  $70 \pm 24$  から  $1438 \pm 174$  nM ( $n = 50$ ) に増大した。この増大はコントロール細胞で検出されたものとよく似ていた。コントロール細胞では、同じ処理で  $[C a^{2+}]_i$  が  $77 \pm 28$  から  $1574 \pm 161$  nM ( $n = 50$ ) に増大した。このことは、G 1 u R 2 (R) 遺伝子が導入された細胞が外部刺激に応答可能であることを示している。

20

次に本発明者らは、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ (T d T) 仲介 d U T P ニック末端ラベリング (T U N E L) 法 (Science, 267, 1445-1449, 1995) を用いて、G 1 u R 2 (R) を発現する C G N H - 8 9 細胞におけるアポトーシス指数を推定し、この値を

25 A x C A L N L G 1 u R 2 (コントロール) だけを感染させた細胞における値と比較した。アポトーシス指数は、T U N E L 陽性細胞の数を、

顕微鏡視野あたりのヨウ化プロピジウム (P I) 陽性核の合計数で割ったもの、と定義された。各培養皿の平均値を得るため、任意に選択した 10 から 15 の視野をサンプルにした。この指数は、G l u R 2 (R) 発現細胞 ( $n = 4$ ) では  $20.2 \pm 4.3\%$  であり、コントロール ( $5.2 \pm 1.2\%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) よりもかなり大きいものだった。

本発明者らは、K i - 6 7 染色指数 (K i - 6 7 陽性細胞の数を、顕微鏡視野あたりのヨウ化プロピジウム (P I) 陽性核の合計数で割ったもの) を計算することで、G l u R 2 (R) 発現細胞の増殖活性についても調べてみた (Lab. Invest., 70, 125-129, 1994)。この指数は、コントロールでは  $12.3 \pm 2.3\%$  で、G l u R 2 発現細胞 (R) では  $< 0.1\%$  ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ) であった。これに対し、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPAR を過剰発現させるための G l u R 2 (Q) cDNA を導入したもの (NeuroReport, 12, 745-748, 2001) は、K i - 6 7 染色指数を  $28.3 \pm 4.8\%$  ( $n = 4$ ,  $P < 0.01$ ) に有意に増大させた。しかし、アポトーシス指数には、有意な変化が検出されなかった ( $4.3 \pm 1.3\%$ )。  $Ca^{2+}$  透過性 AMPAR を過剰発現させるための、アデノウィルスを紹介した G l u R 1 遺伝子の移動により G l u R 1 が過剰発現した際、アポトーシス指数と K i - 6 7 染色指数はそれぞれ  $5.3 \pm 2.3\%$  と  $26.3 \pm 4.5\%$  だった。G l u R 2 (Q) を発現する細胞と、G l u R 1 を過剰発現する細胞の間には、これら 2 つの指数に有意な変化はなかった。

上記結果から、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPAR を介した  $Ca^{2+}$  の流入遮断によって神経膠芽腫細胞中にアポトーシスの変化が起こることが強く示唆される。そのため本発明者は、C G N H - 8 9 細胞における細胞の形態、アポトーシス指数及び K i - 6 7 染色指数に対する AMPAR アンタゴニストの作用を調べてみた。  $20 \mu M$  の N B Q X 又は  $10 \mu M$  の Y M 8

72を2日間用いると、細胞の形態に変化が生じた。つまり、細胞質の突起が退縮し、細胞体が膨化し扁平になり、これはその後のGluR2発現で見られたものと似ていた。さらに、NBQX及びYM872は、  
3.0±1.8%から13.0±2.0% (n=4、P<0.01)、及び  
5 3.8±2.3%から18.0±2.5% (n=4、P<0.01)へと、アポトーシス指数をそれぞれ有意に増大させた。それらは、18.5±3.0%から2.0±1.0% (n=4、P<0.01)、及び16.4±3.5%から<0.1% (n=4、P<0.01)へと、Ki-67染色指数をそれぞれ著しく低下させた。

- 10 Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA Rを発現する他の3つの細胞株(表1のCGNH-NM、MRCH-92及びU87 MG)では、GluR2(R)発現及び、NBQX又はYM872の使用によって、培養細胞における同様の形態的变化が生じ、アポトーシス指数が増大し、Ki-67染色指数が減少した。GluR2(R)遺伝子を導入した細胞に、こうした  
15 AMPA Rアンタゴニストを用いると、実験した4つの細胞株すべてにおいて、細胞の形態とこれら2つの指数にそれ以上の変化が生じることはなかった。これは、ウィルスを介したGluR2(R)の発現とAMPA Rアンタゴニストが同一の標的に作用することを示している。

(Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA Rによる細胞遊走の促進)

- 20 脳白質の遊走腫瘍細胞は紡錘状の形態を呈しており、長い細胞突起を有している場合が多かった。腫瘍細胞のこうした形態は、細胞の遊走に適していると思われた。実際、腫瘍細胞中のGluR2の発現により細胞が扁平化し、その突起が退縮した際には、細胞の遊走が著しく阻害された。これに対し、アデノウィルスで介したGluR2(Q)の導入に  
25 よるCa<sup>2+</sup>透過性AMPA Rの過剰発現は、細胞突起を伸長させ、細胞遊走挙動を促進しているようだった。細胞遊走の程度を定量的に評価す

るため、2つの実験を行った（第4図）。

まず、トランスウェル二重チャンバー培養皿を用いて、Z軸方向の運動性活動を概算した。この培養皿は、直径8  $\mu$ mの孔が多数あいている多孔質膜で上下に仕切られたチャンバーを有していた。上部チャンバーの細胞に、AxCANCre（コントロール）を感染させずに、AxCAGFPとAxCALNLG1uR2を感染させると、少数の細胞がかかる多孔質膜を通過して24時間以内に下部チャンバーに移動した。顕微鏡下の10個の20倍の対物視野で計数した遊走細胞の、別個に行った5回の実験における平均値は、 $4.2 \pm 2.3$ だった（第4図a）。しかし、G1uR2（R）を発現する生存細胞はひとつとして下部に移動せず、ばらばらになった細胞の断片のみが、下部チャンバーで認められた（第4図b）。これに対し、G1uR2（Q）を導入したものは、下部チャンバーに移動する細胞の数を増加させた（ $31.2 \pm 8.3$ 、 $n=5$ 、 $P<0.02$ ）（第4図c）。

次に、クローニングリング（直径7mm）を使用して、培養皿中央部の運動性活動を調べた。リングの内側で細胞を培養し、ウィルス感染の48時間後にリングを取り除いた。その後24時間以内にクローニングリングによる境界を横切った細胞の数を計数した。5回の実験の平均値は、GFP、G1uR2、及びG1uR2（Q）を発現する細胞で、それぞれ $43.2 \pm 5.3$ 、 $15.0 \pm 3.3$ 、 $250.2 \pm 50.3$ だった（第4図d、e及びf）。このように、G1uR2の発現は、細胞の運動性を有意に抑制していた（ $P<0.002$ ）のに対し、G1uR2（Q）の発現は細胞の運動性を促進していた（ $P<0.01$ ）。

腫瘍遊走に対する同様の阻害作用は、10  $\mu$ MのYM872を用いた場合も観察された。G1uR2遺伝子の導入とYM872の使用により、 $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rを発現する他の3つの細胞株でも、細胞遊走が

阻害された。

(ヒト神経膠芽腫のヌードマウスモデルにおける、GluR2発現及びAMPAアンタゴニストによる腫瘍の浸潤の抑制)

本発明者は最後に、インビボでの神経膠芽腫の遊走及び増殖に、GluR2 (R) の発現が影響するかどうかについて調べた (第5図)。この目的のため、まず本発明者は、AxCA GFPを用いてGFPを標識した  $2 \times 10^5$  個のCGNH-89細胞をヌードマウスの大脳皮質下に移植したヒト神経膠芽腫のマウスモデルを使用した。これら移植した細胞は細胞の集合体を形成し、ヒトの外科的試料に見られるように脳梁の有髓経路に浸潤し、実験した15匹のヌードマウスすべてにおいて、脳全体に広範囲に広がっていた。ヌードマウス異種移植片の組織構造は、ヒト神経膠芽腫の特徴、つまり、多形性 (第5図a)、偽柵状配列 (pseudopalisading) を伴う壊死 (第5図b)、及び微小血管の増殖 (第5図c) を示していた。

第5図bは、GFPだけを発現させるためにAxCA GFP及びAxCALNLGluR2を感染させた  $2 \times 10^5$  個の細胞の移植から9日後に皮質下で形成された、腫瘍細胞集合を示している。細胞核をPIで染色したかかる腫瘍細胞は密度が高く、接種部位の細胞中にGFPが検出された (第5図e)。これに対し、GluR2とGFPの両方を発現させるために、AxCA GFPとともにAxCALNLGluR2とAxCANCreを感染させた後で、同数の細胞を接種すると、実験した13匹のヌードマウスのいずれにも、固形の腫瘍細胞集合は形成されなかった (第5図f)。PI染色後の核形態から判断したとおり、腫瘍細胞は増殖を停止し、アポトーシスが始まった (第5図g)。

Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA Rを操作することでインビボでの腫瘍の成長に変化が生じるかどうかをさらに定量的に評価するため、CGNH-89



細胞をヌードマウスの皮下組織に移植して作製した腫瘍の成長に対して、  
G 1 u R 2 と G 1 u R 2 (Q) の発現及び／又は A M P A R アンタゴニ  
ストの Y M 8 7 2 の使用が及ぼす作用を調べた(第 6 図)-(第 6 図 a 及び  
b)。アデノウィルスを紹介した G 1 u R 2 の発現は、腫瘍に A x C A N C  
5 r e を感染させずに A x C A L N L G 1 u R 2 を感染させた(n = 1 2、  
P < 0 . 0 0 1) 場合と比較して、移植の 2 2 日後の腫瘍のサイズだけ  
ではなく腫瘍の成長速度を有意に抑制した。G 1 u R 2 (Q) の発現は、  
腫瘍の成長を促進する傾向があったが、移植の 2 2 日後の腫瘍のサイズ  
を増大させることはなかった。Y M 8 7 2 を腹腔内投与すると、ビヒク  
10 ル(リン酸緩衝液; P B S)(n = 1 2、P < 0 . 0 0 1) を投与した場  
合と比較して、腫瘍のサイズが有意に縮小した。G 1 u R 2 (Q) を発  
現する腫瘍(n = 1 2、P < 0 . 0 0 1) の成長も阻害されたが、G 1  
u R 2 を発現する腫瘍についてはそれ以上の阻害作用を及ぼさなかった。

組織学的分析により、ビヒクル単独で処理した腫瘍細胞に多数の分裂  
15 細胞が存在することがわかった(第 6 図 c)。Y M 8 7 2 で処理した腫瘍  
組織(第 6 図 d)、又は G 1 u R 2 を発現する腫瘍組織(第 6 図 e 及び f)  
において、分裂細胞はほとんど検出されなかった。そのかわり、多数の  
アポトーシス細胞が観察された。G 1 u R 2 (Q) を発現する腫瘍細胞  
の増殖は Y M 8 7 2 の使用により阻害された(第 6 図 g、h 及び i)。ま  
20 た、Y M 8 7 2 による処理で G 1 u R 2 を発現する細胞における腫瘍の  
増殖がそれ以上阻害されることはなかった(第 6 図 j)。

#### [実験の考察]

神経膠芽腫の患者から得た外科的試料において、有髄経路中の遊走細  
胞は紡錘状又は両極性の形態を呈しており、G 1 u R 1 及び／又 G 1 u  
25 R 4 タンパク質を豊富に発現していた。かかる外科的試料由来の移植体  
培養物の周辺部に位置する遊走細胞も、長い細胞突起を有する場合が多

い紡錘状の形態を呈しており、GluR1を発現していた。アデノウィ  
ルスを介したGluR1又はGluR2 (Q) の導入によって $Ca^{2+}$ 透  
過性AMPA Rが過剰発現すると、長い細胞突起を有する紡錘状の形態  
を呈している遊走細胞の数が増大した。これに対し、腫瘍細胞の運動性  
5 は、GluR2 (R) の発現によって細胞の形態が多角形化し扁平化し  
た後、著しく抑制された。紡錘状の形態や膨化した突起は、細胞遊走に  
適していると思われる。紡錘状の形態によって、密集した有髄経路又は  
CNS組織中の狭い空間に、腫瘍細胞が浸潤できると考えられるからで  
ある。

- 10 細胞突起の伸長は、細胞遊走の第一歩と考えられ、その後で細胞体の  
移動及び後部突起の退縮が続く (Cell, 84, 371-379, 1996)。グリア細  
胞と $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rの形態間の因果関係について、GluR2  
(R) の発現がグリア突起の著しい退縮を引き起こす一方で、GluR  
2 (Q) の過剰発現が、マウス小脳のベルクマングリア様培養細胞  
15 (Bergmann glia-like cultured cells) におけるそれらの膨化を引き起  
こすことを、本発明者は以前に示している (NeuroReport, 12, 745-748,  
2001)。しかし、 $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rを介したグリア突起の膨化に  
関与する詳しい機構は、いまだ解明されていなかった。

- 本実験において、本発明者は、 $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rの $Ca^{2+}$ 非  
20 透過性受容体への変換が、アポトーシス指数を増大させ、腫瘍細胞の増  
殖活性を抑制することを示した。このように、抗アポトーシスシグナル  
伝達カスケードを刺激するには、こうした受容体を通じた $Ca^{2+}$ の流入  
が必要と思われる。この考察は、適量の $Ca^{2+}$ の流入は、小脳顆粒細胞  
及びNB108神経芽細胞腫細胞など、いくつかの培養細胞の生存に必  
25 須であるという以前の知見により裏付けられる (J. Neurosci., 7,  
2203-2213, 1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6421-6425, 1989、

Nature, 396, 584-587, 1998)。Yano et al. (Nature, 396, 584-587, 1998) は、NB 108 神経芽細胞腫細胞において、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体を介した  $Ca^{2+}$  の流入により供給された  $Ca^{2+}$  が、 $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ (CaMKK) を活性化し、次にはそれがセリン/スレオニンキナーゼ、Akt (プロテインキナーゼB) をリン酸化することを明確に示した。Akt の活性化で各種抗アポトーシスシグナルが放出されることは知られており、それにより細胞の生存も促進される (Nature, 396, 584-587, 1998)。

- 10 AMPAR の内在性アゴニストはグルタミン酸である。本実験における培養培地にはウシ胎児血清 (FCS) 及び最大で  $100 \mu M$  のグルタミン酸が添加されていた。グルタミン酸の存在は、腫瘍細胞の増殖のみならず、紡錘状の形態を維持するうえでも必須であった。10% の透析済 FCS を添加したグルタミン酸を含まない培地で細胞を 4 ~ 5 日培養
- 15 すると、かかる細胞は多角形の形態を有するようになり、アポトーシス細胞の数が増加した。こうした変化は  $100 \mu M$  のグルタミン酸を添加すると元に戻った。明らかな疑問点は、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPAR を活性化するのに十分な濃度のグルタミン酸が増殖し、遊走している脳内の腫瘍細胞に実際に供給されているのか否かということである。移植した神
- 20 経膠腫細胞が引き続きグルタミン酸を分泌し、その結果、細胞外グルタミン酸が検出可能な程度に増大すること、及び、グルタミン酸の放出が多い神経膠腫は、明らかな成長上の優位性をもつことがわかっている (Nature Med., 7, 1010-1015, 2001)。星状細胞が各種サイトカイン及び成長因子を分泌する場合と同様に自己分泌という形で、神経膠芽腫細胞がグルタミン酸を分泌している可能性が高い (Nature, 391, 281-285,
- 25 1998, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57, 653-663, 1998)。

NMDA及びAMPA受容体のアンタゴニストはともに、神経膠腫細胞及び神経芽細胞腫細胞を含む多様な型の腫瘍細胞の増殖と遊走を阻害することがわかっている(Nature Med., 7, 1010-1015, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6372-6377, 2001)。本研究において、本発明者らは

5 は  $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rがヒト神経膠芽腫細胞の遊走及び増殖を促進するうえで重要な役割を果たしていること、及び、GluR2の発現又はYM872による $Ca^{2+}$ 透過性AMPA Rの遮断が、腫瘍の成長を効果的に抑制することを示した。このように、 $Ca^{2+}$ 透過性グルタミン酸受容体は、脳腫瘍治療の標的となると考えられる。

10 [実験に用いた手法]

(外科的試料と細胞培養物)

本実験で調べた16個の外科的試料の組織構造を、WHO分類に従って多形性神経膠芽腫と診断した。文献(Acta Neuropathol., 94, 425-435, 1997, J. Neurosci. Res., 51, 526-535, 1998)記載のとおり、細胞培養物を調製した。神経膠芽腫の4細胞株のうち、CGNH-89は高い

15 発ガン性を示すため、ヌードマウスへの異種移植に使用した。10%のFCS及び2mMのグルタミンを添加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies社製)で、細胞を培養した。酵素循環法により定量したこの培地のグルタミン酸濃度は、

20  $7 \pm 5 \mu M$  ( $n=4$ ) だった(Brain Res., 573, 197-203, 1992)。

(アデノウィルスベクターを用いた遺伝子移植)

本発明者らは、下記の組換え型アデノウィルスを作製した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320-1324, 1996, Nucl. Acids Res., 23, 3816-3821, 1995)。

25 (1) AxCALNLGluR1、AxCALNLGluR2及びAxCALNLGluR2(Q):それぞれ、ラットGluR1、GluR2

及び G 1 u R 2 (Q) を発現させるための発現切替ユニットで、C A G  
プロモーター、l o x P 配列、スタッパー (stuffer) 遺伝子 (ネオ耐  
性遺伝子)、ポリ (A) シグナル、第二 l o x P 部位、G 1 u R 1、G 1  
u R 2 又は G 1 u R 2 (Q) コーディング配列、及びもうひとつのポリ  
5 (A) シグナルで構成されている (Mol. Brain Res., 65, 176-185, 1999)。  
ラット G 1 u R 1 及び G 1 u R 2 c D N A は、S. Heinemann 博士及び M.  
Hollmann 博士より供与された。

(2) A x C A N C r e 及び A x C A G F P : C r e リコンビナーゼ及  
び E G F P (Clontech 社製) をそれぞれ発現させるための組換え型アデ  
10 ノウィルス。実験の 2 ~ 5 日前に、感染の多重度 (M O I) 5 で、細胞  
を各組換え型アデノウィルスに感染させた。

(組織構造)

文献 (NeuroReport, 12, 745-748, 2001、Acta Neuropathol., 94,  
425-435, 1997) 記載のとおり、G 1 u R 1、G 1 u R 2、G 1 u R 2 /  
15 G 1 u R 3、G 1 u R 4 (Chemicon 社製)、G F A P (Virchows Arch. A  
Pathol. Anat. Histopathol., 405, 299-310, 1985)、及びビメンチン (V  
9、Dakopatts A/S 社製) に対する選択性抗体を用いて、免疫組織化学  
的染色を行った。ジアミノベンチジンで、免疫応答性を視覚化した。二  
重免疫蛍光法のため、F I T C、ローダミン、及び Alexa 594 で標識し  
20 た二次抗体 (Molecular Probe 社製) を用いて、結合した抗体を視覚化  
した。染色した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024E、Bio-Rad 社  
製) で観察した。Kondo et al. (J. Neurosci., 17, 1570-1581, 1997)  
が記載したものと同一方法で、in situ ハイブリダイゼーションを行っ  
た。

25 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R))

試料から調製した R N A の部分標本 1 0 0 n g をランダムヘキサマー



(ロッシュ・ディアグノティクス社製) を用いて逆転写し、G l u R 1 から G l u R 4 (Neuron, 12, 383-388, 1994) を同時に増幅したプライマー (センスプライマー: 5' - C C T T T G G C C T A T G A G A T C T G G A T G T G - 3' (配列番号 1)、アンチセンスプライマー: 5' - T C G T A C C A C C A T T T G T T T T T C A - 3' (配列番号 2)) を用いて、逆転写産物を 94℃ で 20 秒間変性させ、50℃ で 20 秒間アニーリングし、72℃ で 20 秒間伸長反応させるという条件下で P C R サイクルを 35 回繰り返した。

G l u R 1 (1712 から 1733 番目の塩基配列: 5' - A A G A G G G A C G A G A C C A G A C A A C - 3' (コーディング配列の最初のヌクレオチドである位置 1 ; 配列番号 3))、G l u R 2 (1732 から 1755 番目の塩基配列: 5' - G A A G A T G G A A G A G A A A C A C A A A G T - 3' (配列番号 4))、G l u R 3 (1749 から 1771 番目の塩基配列: 5' - G G A A G A C A A C A A T G A A G A A C C T C - 3' (配列番号 5)) か、または G l u R 4 (1747 から 1766 番目の塩基配列: 5' - G A A G G A C C C A G C G A C C A G C C - 3' (配列番号 6)) の特異的なセンスプライマー、及び、1 回目の増幅に使用した共通アンチセンスプライマーを用いて、サブユニットを特異的に増幅するための 2 回目の P C R (35 サイクル) を行った。この 2 回目の増幅による産物 (G l u R 1 は 637 b p、G l u R 2 は 638 b p、G l u R 3 は 657 b p、G l u R 4 は 626 b p) を、G l u R 1 には B g l I、G l u R 2 には B s p 1 2 8 6 I、G l u R 3 には A v a I、及び G l u R 4 には P v u II というように、特異的な制限酵素を用いて分解した。

25 (細胞内 C a <sup>2+</sup> イメージング)

室温で 40 分間、細胞に f u r a - 2 A M (Dojin 社製) を負荷した。

Argus/HiSCA system (Hamamatsu Photonics 社製) を使用して、励起波長 340 nm と 380 nm で、蛍光イメージを得た。340 / 380 の蛍光比を、文献 (Cell, 88, 49-55, 1997) 記載のとおり  $[Ca^{2+}]_i$  に変換した。

5 (TUNEL、増殖及び遊走の分析)

- TUNEL 及び細胞増殖の分析のため、標準培養培地を満たした Lab-Tek 4-well ガラススライドに、 $2 \times 10^4$  個/ウェルの密度で細胞を載せた。載せてから 6 時間後に培地をグルタミン酸を含まないものに取り替え、細胞にアデノウィルスに感染させた。載せてから 48 時間後、
- 10 グルタミン酸 ( $100 \mu M$ ) を培地に添加し、感染 5 日後に細胞を固定した。In Situ Cell Death Detection kit (MBL 社製) を用いて TUNEL 分析を行い、抗 Ki-67 モノクローナル抗体 (Dako 社製) 染色指数を用いて細胞増殖分析を行った。遊走分析は、トランスウェル・チャンバー (孔径  $8 \mu m$ ) (Corning Corstar Corp. 社製) 中で行った。
- 15 上部チャンバーに  $5 \times 10^4$  個/ウェルの密度で細胞を載せた。載せてから 6 時間後に、10% の透析済 FCS を添加した、グルタミン酸を含まない培地で、かかる細胞に組換え型アデノウィルスに感染させた。感染の 48 時間後、グルタミン酸 ( $100 \mu M$ ) を培地に添加した。細胞をさらに 24 時間培養し、多孔質膜を通過して遊走した細胞の数を対
- 20 物 20 倍の顕微鏡で計数した。

- また、別の遊走分析実験で、一方の端部をシリコングリースでコーティングしたガラス製クローニングシリンダー (直径 7 mm) を培養皿の中央に置いた。シリンダーの中に  $2 \times 10^4$  個の細胞を入れた。感染の 48 時間後、クローニングリングを除去し、細胞をさらに 24 時間培養
- 25 した。その後、クローニングリングによる境界を越えた細胞の数を計数した。

## (動物モデル)

培養培地中にCGNH-89細胞を $1 \times 10^7 / 100 \mu l$ で懸濁した。AxCA GFP及びAxCALNLG1uR2を感染させ、さらにAxCANCreを感染させた懸濁液、或いは感染させなかった懸濁液  
5 の部分標本 $2 \mu l$ を、エーテル麻酔下のヌードマウスの脳に定位的に注入した。そして、注入の9～14日後に脳組織を調べた。

また、腫瘍の成長に対するアデノウイルスによるG1uR2 (R) 及びG1uR2 (Q) の発現の効果を、AMPA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるYM872を用いたものと、用いないものについて、皮下腫  
10 瘍中で定量的に評価した。細胞懸濁液 ( $1 \times 10^7 / 100 \mu l$ ) を、5～6週齢(体重18～20g)のヌードマウスの脇腹に皮下注射した。アデノウイルス ( $1 \times 10^7$  PFU、全量にして $100 \mu l$ のPBSで希釈) を、腫瘍接種後5日目に、27番の針を用いて腫瘍内に一度投与した。AxCANCreを含まないAxCALNLG1uR2を、コン  
15 トロール用に投与した。

Yamanouchi Pharmaceutical Company より供与されたYM872をPBSに溶解させた。投与量 $10 mg / kg$ 、 $50 mg / kg$ 、及び $100 mg / kg$ でYM872を2週間にわたって毎日腹腔内注射した(腫瘍接種の1日後に開始した)ところ、腫瘍の成長が投与量依存的に阻害  
20 されているのが観察された。この一連の実験では、 $100 mg / kg$ のYM872を使用した。コントロールとして、PBS ( $100 \mu l$ ) を腹腔内に投与した。 $(縦 \times 横^2) / 2$ という公式にしたがい、腫瘍の容積を計算した。各実験の最後に、腫瘍組織の組織学的分析を行った。

## (データ分析)

25 データは、平均 $\pm s.e.m$ として表されている。無対t検定又は一元配置分散分析 (ANOVAs : Scheffes test for post-hoc

comparison) により、統計上の比較を行った。

[図の説明]

(図1 ヒト神経膠芽腫細胞で発現したA M P A受容体を示す写真)

a ~ c ; 外科的標本原本の連続切片である。a ; ヘマトキシリン-エ  
5 オシン (H E) で染色した浸潤腫瘍細胞の軟膜下での蓄積を示す。b ;  
in situ ハイブリダイゼーションで検出したG l u R 1 m R N Aの発  
現 (ニトロブルーテトラゾリウムクロライド、青色) を示す。c ; G l  
u R 1 の免疫蛍光法 (ローダミン、赤色) によるイメージを示す。

d ~ g ; 外科的標本原本の連続切片 (G N S - 3 1 4 8) である。d ;  
10 浸潤腫瘍細胞の軟膜下での蓄積 (H E 染色) を示す。e ; 抗G l u R 1  
抗体を用いた免疫染色である。f ; 抗G l u R 2 抗体を用いた免疫染色  
である。g ; 抗G l u R 4 抗体を用いた免疫染色である。

h ~ k ; d ~ g と同じ標本の隣接組織である。h ; 大脳皮質の浸潤腫  
瘍細胞 (H E 染色) である。i、j 及びk ; 抗G l u R 1 抗体、抗G l  
15 u R 2 抗体及び抗G l u R 4 抗体をそれぞれ用いた免疫染色を表す。

l ~ n ; 抗G l u R 1 抗体 (Alexa 594、赤色) (l) 及び抗G l u R  
4 抗体 (F I T C、緑色) (m) を用いた免疫染色、並びに一次培養の腫  
瘍細胞においてそれらを組み合わせたイメージ (n) を表す。

o ~ q ; 抗G l u R 1 抗体 (Alexa 594、赤色) (o) 及び抗G l u R  
20 2 抗体 (F I T C、緑色) (p) を用いた免疫染色、並びに腫瘍細胞にお  
いてそれらを組み合わせたイメージ (q) を示す。q 中のスケールバー  
は、a ~ g については1 0 0  $\mu$  m、h ~ q については5 0  $\mu$  m。

r ~ s ; 一次培養の腫瘍細胞 (r) 及び切除前の腫瘍細胞に隣接して  
いた正常な脳組織 (s) における、G l u R 1 ~ 4 に特異的なプライマ  
ーを用いたR T - P C R 分析結果である。r とs の両方において、右と  
25 左の4 レーン (R 1 からR 4) は、各G l u R 1 ~ 4 D N A に特異的な

制限酵素による分断の前後におけるPCR産物の電気泳動を、それぞれ示すものである。右側のレーンにある分断した断片の大きさ：BglIで切断したGluR1については189及び448bp、Bsp1286Iで切断したGluR2については368及び270bp、AvaIで切断したGluR3については420及び237bp、PvuIIで切断したGluR4については379及び247bp。レーンφは、密集した500bpバンドをそなえたDNAサイズマーカーを示す。

(第2図 培養腫瘍細胞における、AMPAが誘導した $[Ca^{2+}]_i$ の変化を示す写真)

10 a～c; fura-2 AMを負荷した一次培養の腫瘍細胞における、AMPAが誘導した $[Ca^{2+}]_i$ の増加を示す。励起波長340nmでの蛍光イメージ(a)、並びに200μMのAMPA及び100μMのCTZに曝露する前(b)及び曝露中(c)における、340/380nm比の仮染色イメージを示す。

15 d～f; 移植片培養物から取り出された単層中の細胞における、AMPAが誘導した $[Ca^{2+}]_i$ の増加を示す。これは、a～cと同じ装置でイメージを撮影した。

20 g～i; ビメンチン(g、FITC、緑色)及びGluR1(h、ローダミン、赤色)の二重免疫蛍光法並びにそれらを組み合わせたイメージ(i)を表す。f中のスケールバーは、d～fについて20μm、i中のスケールバーは、a～c及びg～iについて100μmを示す。

(第3図 アデノウィルスが介するAMPA受容体サブユニットの発現の作用を示す写真)

25 a～c; コントロール。培養細胞(CG NH-89)にAxCAGFPとAxCALNLGluR2を感染させ、AxCANC reを感染させなかった。GFP蛍光(a)、GluR1の免疫蛍光法(b)、及びそ



れらを組み合わせたイメージ（c）である。

d～f；G1uR2を発現する細胞である。Ax CAGFP、Ax CALNLG1uR2、及びAx CANCreを感染させた。GFP蛍光（d）、G1uR2の免疫蛍光法（e）及びそれらを組み合わせたイメージ（f）である。

g；コントロール用にAx CALNLG1uR2のみを感染させ、ピメンチン（FITC、緑色）とヨウ化プロピジウム（PI）（赤色）で二重染色した細胞である。

h；Ax CALNLG1uR2とAx CANCreを細胞に感染させ、ピメンチン（FITC、緑）とG1uR2（ローダミン、赤）を対象として二重染色した細胞である。G1uR2タンパク質発現細胞中の分断したピメンチンフィラメントに注目のこと。

i；Ax CAGFP、Ax CALNLG1uR2及びAx CANCreを細胞に感染させ、PIで染色した細胞である。アポトーシス小体及び核における泡状突起形成に注目のこと。

j～l；G1uR1を過剰発現する細胞である。それらの細胞を、Ax CALNLG1uR1及びAx CANCreを用いて感染させた。ピメンチン（j、FITC、緑色）及びG1uR1（k、ローダミン、赤色）の免疫蛍光法及びそれらを組み合わせたイメージ（l）を示す。

m～o；Ax CAGFP（m）、Ax CAGFP、Ax CALNLG1uR2及びAx CANCre（n）、並びにAx CAGFP、Ax CALNLG1uR2（Q）及びAx CANCre（o）を感染させたU87-MG細胞である。それらをG1uR2（ローダミン、赤色）を対象として染色した。GFP及びG1uR2の免疫蛍光法の、組み合わせたイメージを示す。i中のスケールバーは、a～f及びj～oについては100μm、g～iについては20μm。

p ~ x ; f u r a - 2 A M を用いた  $[Ca^{2+}]_i$  の測定の結果を表す。  
コントロールの C G N H - 8 9 細胞 (p ~ r) 並びに G l u R 2 (s ~  
u) 及び G l u R 2 (Q) (v ~ x) を発現する細胞である。左から右に  
向かって、励起波長 3 4 0 n m の蛍光イメージ、2 0 0  $\mu$  M の A M P  
5 A 及び 1 0 0  $\mu$  M の C T Z に曝露する前及び曝露中における、3 4 0 /  
3 8 0 n m 比の仮染色イメージである。

(第 4 図 G l u R 2 及び G l u R 2 (Q) の発現が細胞の遊走に及ぼ  
す作用を示す写真)

a ~ c ; トランスウェル二重チャンバーを用いて調べた腫瘍細胞の運  
10 動性を示す図である。多孔質膜下にある下部チャンバー中の細胞の共焦  
点顕微鏡像である。抗 G l u R 2 抗体 (ローダミン、赤色) 及び抗ピメ  
ンチン抗体 (F I T C、緑色) で細胞を染色した。a ; A x C A L N L  
G l u R 2 を感染させ、A x C A N C r e を感染させなかった細胞であ  
る。ピメンチンを発現する細胞のいくつかは遊走して、2 4 時間以内に  
15 多孔質膜を通過していた。b ; G l u R 2 を発現させるために A x C A  
N C r e と A x C A L N L G l u R 2 を感染させた細胞である。2 4 時  
間後に下部チャンバーで認められたのは、分断された細胞の断片のみで  
あった。c ; G l u R 2 (Q) を発現させるために A x C A N C r e 及  
び A x C A L N L G l u R 2 (Q) を感染させた細胞である。a よりも  
20 多数の腫瘍細胞が遊走して、2 4 時間以内に多孔質膜を通過していた。

d ~ f ; クローニングリングを用いて調べた腫瘍細胞の運動性を表す。  
A x C A L N L G l u R 2 のみ (d、コントロール)、G l u R 2 発現細  
胞 (e)、又は G l u R 2 (Q) 発現細胞 (f) を感染させた細胞の、ク  
ローニングリング除去後 2 4 時間以内の遊走を示す。抗ピメンチン抗体  
25 及び抗 G l u R 2 抗体で細胞を染色した。白線はクローニングリングに  
よる境界を示す。f 中のスケールバーは、a ~ c については 5 0  $\mu$  m、

d ~ f については  $100\mu\text{m}$  を示す。

(第5図 G1uR2 の発現が、腫瘍移植に及ぼす作用を示す写真)

a ~ c ; 培養した神経膠芽腫細胞のヌードマウス皮下への移植により形成された腫瘍の組織病理を表す。かかる腫瘍は、多形性 (a)、  
5 pseudopalisading を伴う壊死 (b)、及び微小血管の増殖 (c) を特徴としている。図中「v」は腫瘍血管 (HE 染色) を示す。

d ;  $2 \times 10^5$  個の培養神経膠芽腫細胞の、ヌードマウスの大脳皮質下領域への移植後 9 日目における腫瘍形成状況を表している。GFP (緑色) を発現させるため、移植の 2 日前に、AxCAGFP 及び AxCALNLG1uR2 を培養細胞にそれぞれ MOI 5 で感染させ、PI (赤色) で染色していた。e ; d のボックス部分の拡大図である。  
10

f ;  $2 \times 10^5$  個の培養神経膠芽腫細胞の移植後 14 日目における細胞である。GFP と G1uR2 をともに発現させるため、移植の 2 日前に、AxCAGFP、AxCALNLG1uR2、及び AxCANCre を培養細胞にそれぞれ MOI 5 で感染させていた。  
15

g ; f のボックス部分の拡大図である。G1uR2 の発現により生じた核のアポトーシス状形態に注目のこと。g 中のスケールバーは、a、e 及び g については  $50\mu\text{m}$ 、b については  $100\mu\text{m}$ 、c については  $75\mu\text{m}$ 、d については  $1500\mu\text{m}$ 、及び f については  $1000\mu\text{m}$  を示す。  
20

(第6図 AMPA 受容体の操作が腫瘍の成長に及ぼす作用を示す図)

a ; 各種の処理が、ヌードマウスの皮下組織に移植した腫瘍の成長速度に及ぼす作用 : PBS の注入 (YM872 の使用に対するコントロールとしてのピヒクル、(▽) ; G1uR2 (Q) の発現 (□) ; AxCANCre を含まない AxCALNLG1uR2 の注入 (G1uR2 及び G1uR2 (Q) を発現させるためのコントロールとしてのベクター、  
25

(●); G1uR2 (Q) の発現及びYM872の使用 (△); G1uR2の発現 (◆); YM872の使用 (■); G1uR2の発現及びYM872の使用 (▲)。各処理には、12匹の動物を使用した。各区画は腫瘍容積の平均±s. e. m. (n=12) を表す。

- 5      b; 接種の22日後に測定した腫瘍容積の区画を表す。各処理のため、12匹の動物から得た生データを割り振った。\*はコントロール(ビヒクル又はベクターのいずれか)に関する $p < 0.001$ での有意な差異を示す。

- 10      c ~ f; ビヒクル(c) 及びYM872(d) で処理した腫瘍組織、及びG1uR2遺伝子が送達された腫瘍組織(e、f)の組織構造を表す。c、d及びe; HE染色である。f; 抗G1uR2抗体を用いた免疫染色である。

g ~ h; G1uR2 (Q) 遺伝子が送達された腫瘍組織におけるHE染色(g) 及び抗G1uR2抗体を用いた免疫染色(h) である。

- 15      i; YM872で処理した、G1uR2 (Q) を発現する腫瘍組織のHE染色を表す。

j; YM872で処理した、G1uR2を発現する腫瘍組織のHE染色を表す。c ~ jの組織は、腫瘍接種の22日後に採取したものである。j中のスケールバーは、c ~ jについて50 μmを示す。

20

#### 産業上の利用可能性

- 本発明により、動物の発症する脳腫瘍細胞において、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制することができる。特に、本発明により、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットG1uR2の遺伝子を
- 25      脳腫瘍細胞に導入することにより、脳腫瘍細胞における $Ca^{2+}$ 透過性を

- 制御し、脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制することができるため、最も悪性であり、遊走性及び湿潤性の高い腫瘍として知られている神経膠芽腫のような脳腫瘍の治療に有効な手段となる。更に、本発明は、動物の発症する脳腫瘍細胞において、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することにより、脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性を測定することを可能とするため、該方法を用いて、脳腫瘍の悪性度を把握することが可能であり、脳腫瘍の診断や予防或いは治療のための有効な手段となる。
- 5



## 請 求 の 範 囲

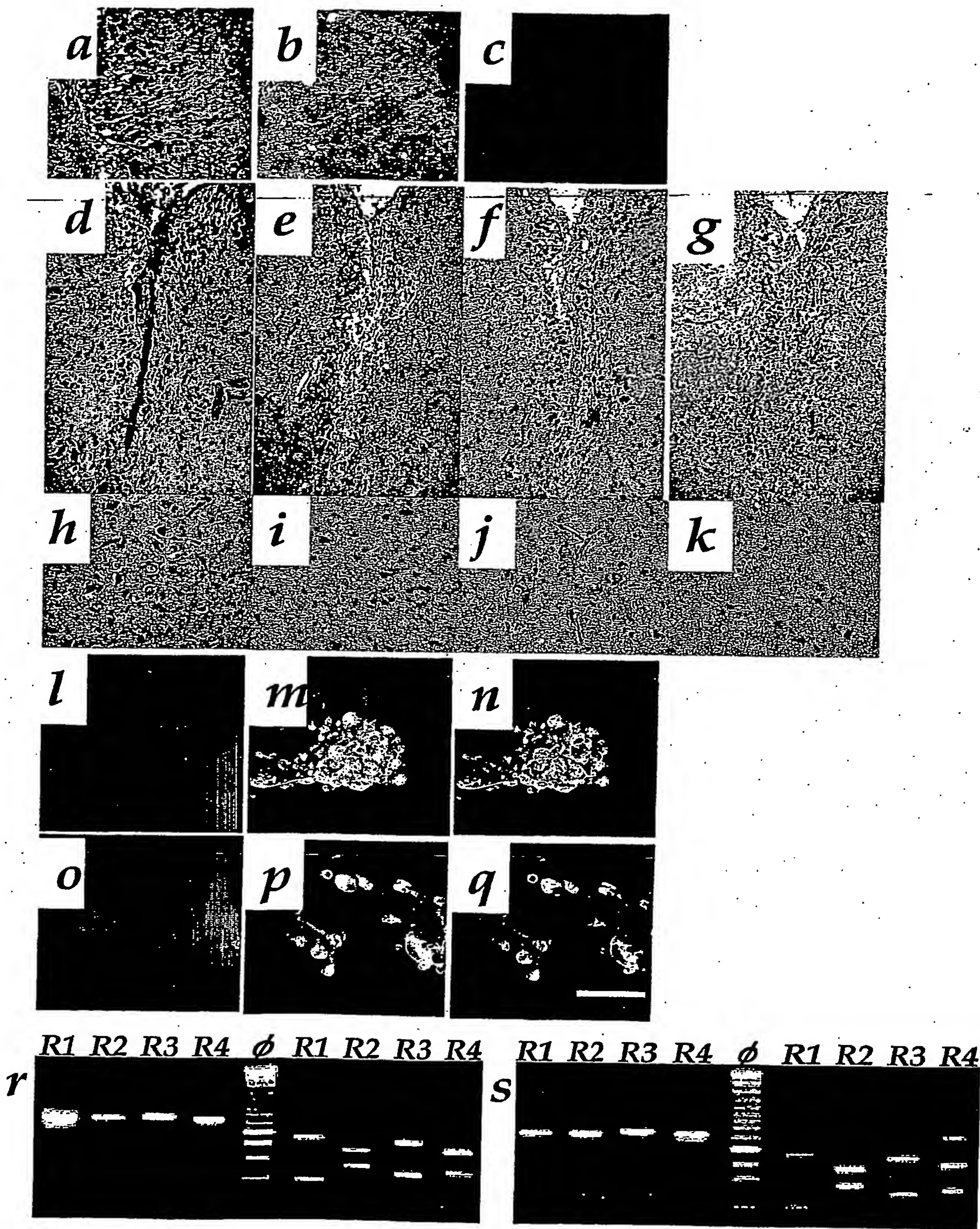
1. 動物の発症する脳腫瘍細胞において発現するAMPA型グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性を制御することにより、脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法。
2. グルタミン酸受容体サブユニットによる $Ca^{2+}$ 透過性の制御を、動物の発症する脳腫瘍細胞に、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を導入し、発現させることにより行うことを特徴とする請求項1記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法。
3. AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子が、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2のcDNAであることを特徴とする請求項2記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法。
4. 動物の発症する脳腫瘍細胞に、発現ベクターを用いて、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を導入し、発現させることを特徴とする請求項2又は3記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法。
5. 発現ベクターが、アデノウイルスを用いたベクターであることを特徴とする請求項4記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法。
6. 脳腫瘍細胞が、神経膠芽腫細胞であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の脳腫瘍細胞の増殖と浸潤を抑制する方法。
7. AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR2の遺伝子を、脳腫瘍細胞への遺伝子導入・発現用ベクターに組み込んだことを特徴とする脳腫瘍治療用遺伝子発現ベクター。
8. 発現ベクターが、アデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項7記載の脳腫瘍治療用遺伝子発現ベクター。

9. 請求項 7 又は 8 記載の脳腫瘍治療用遺伝子発現ベクターをセットしたことを特徴とする脳腫瘍治療用遺伝子導入用キット。

10. 動物の発症する脳腫瘍細胞における AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの発現を検出・測定することを特徴とする脳腫瘍細胞の  
5 増殖・浸潤活性の測定方法。

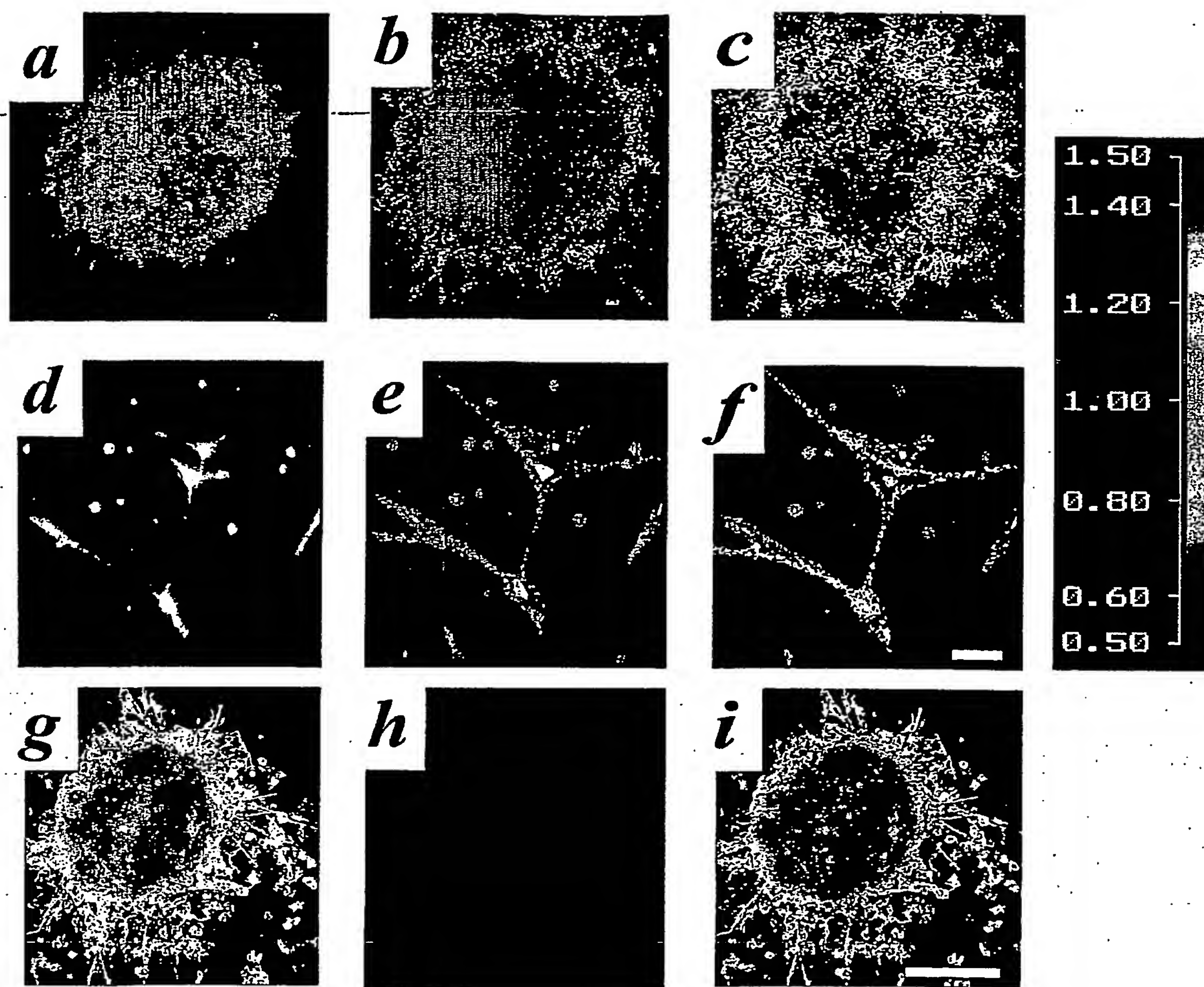
11. グルタミン酸受容体サブユニットの発現の検出・測定が、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の検出・測定であることを特徴とする請求項 10 記載の脳腫瘍細胞の増殖・浸潤活性の測定方法。

第 1 図

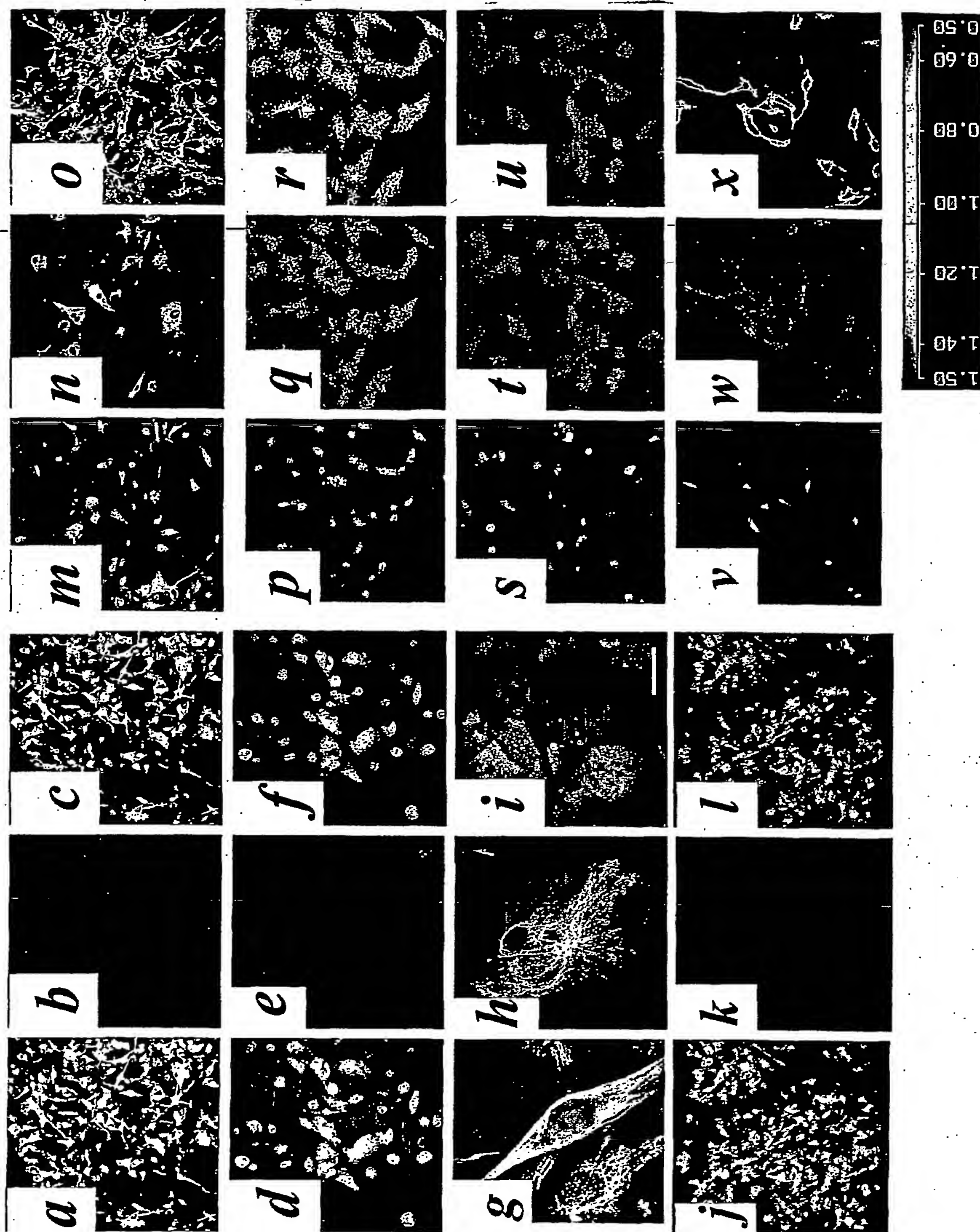




第 2 図

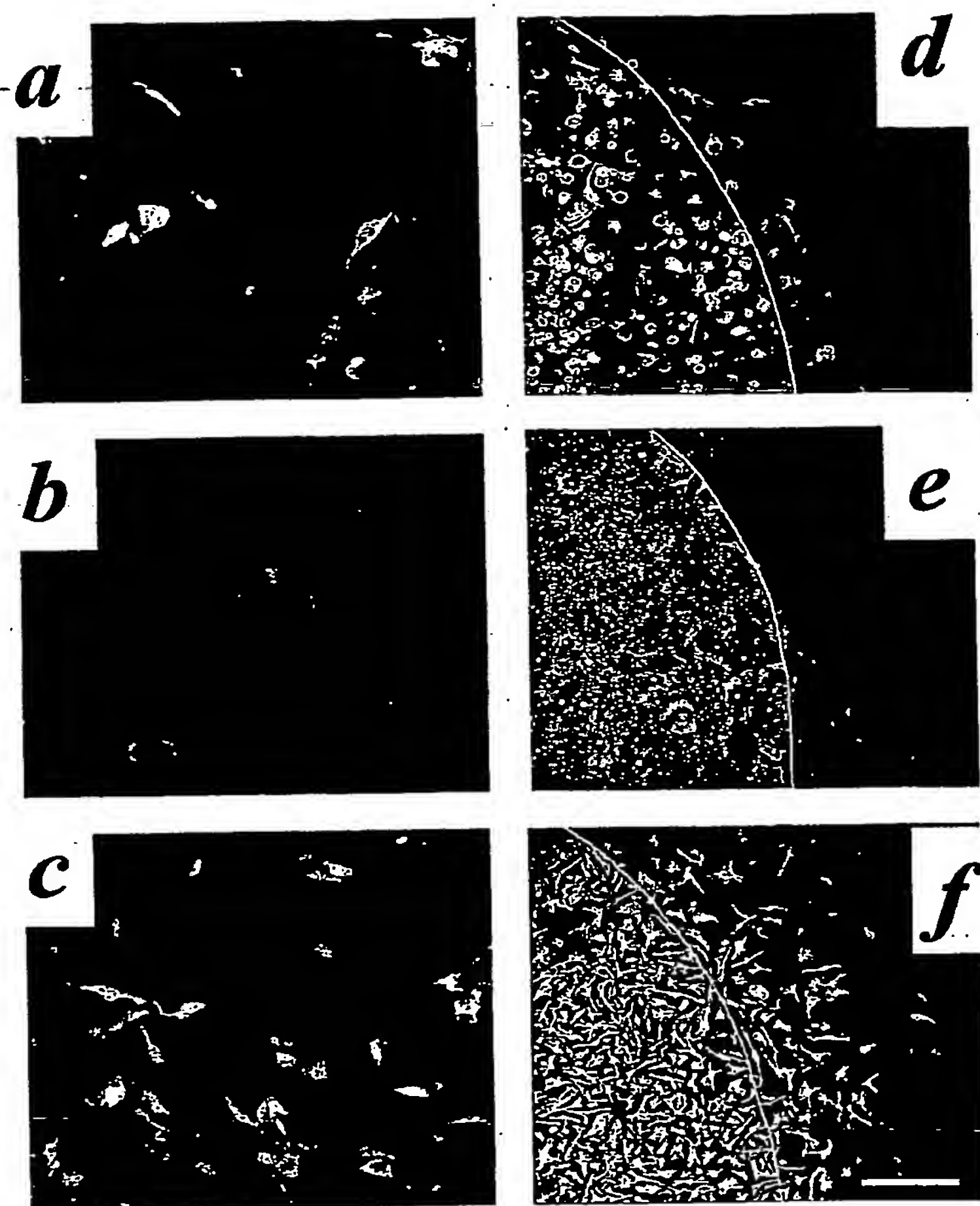


第 3 図

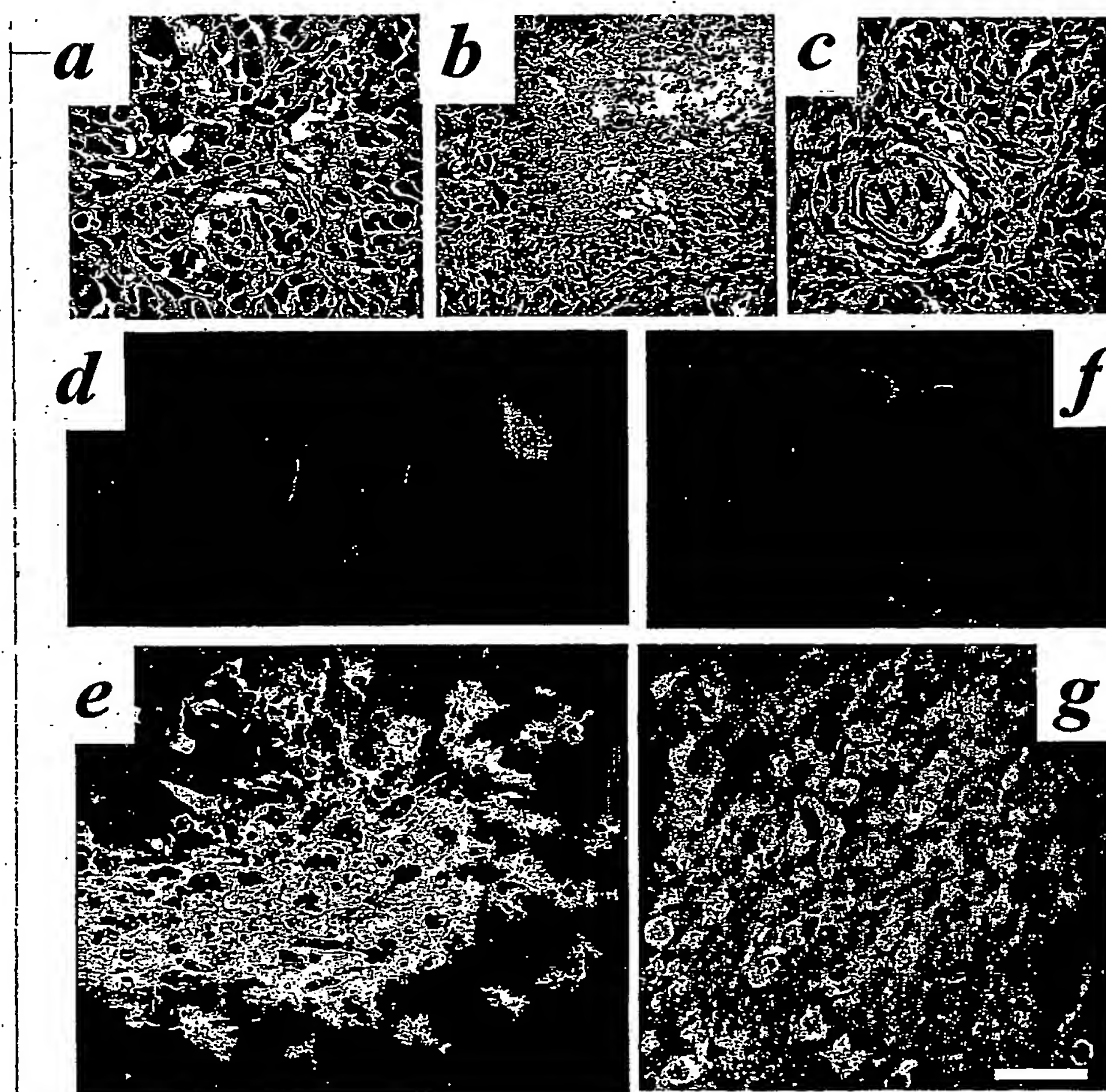




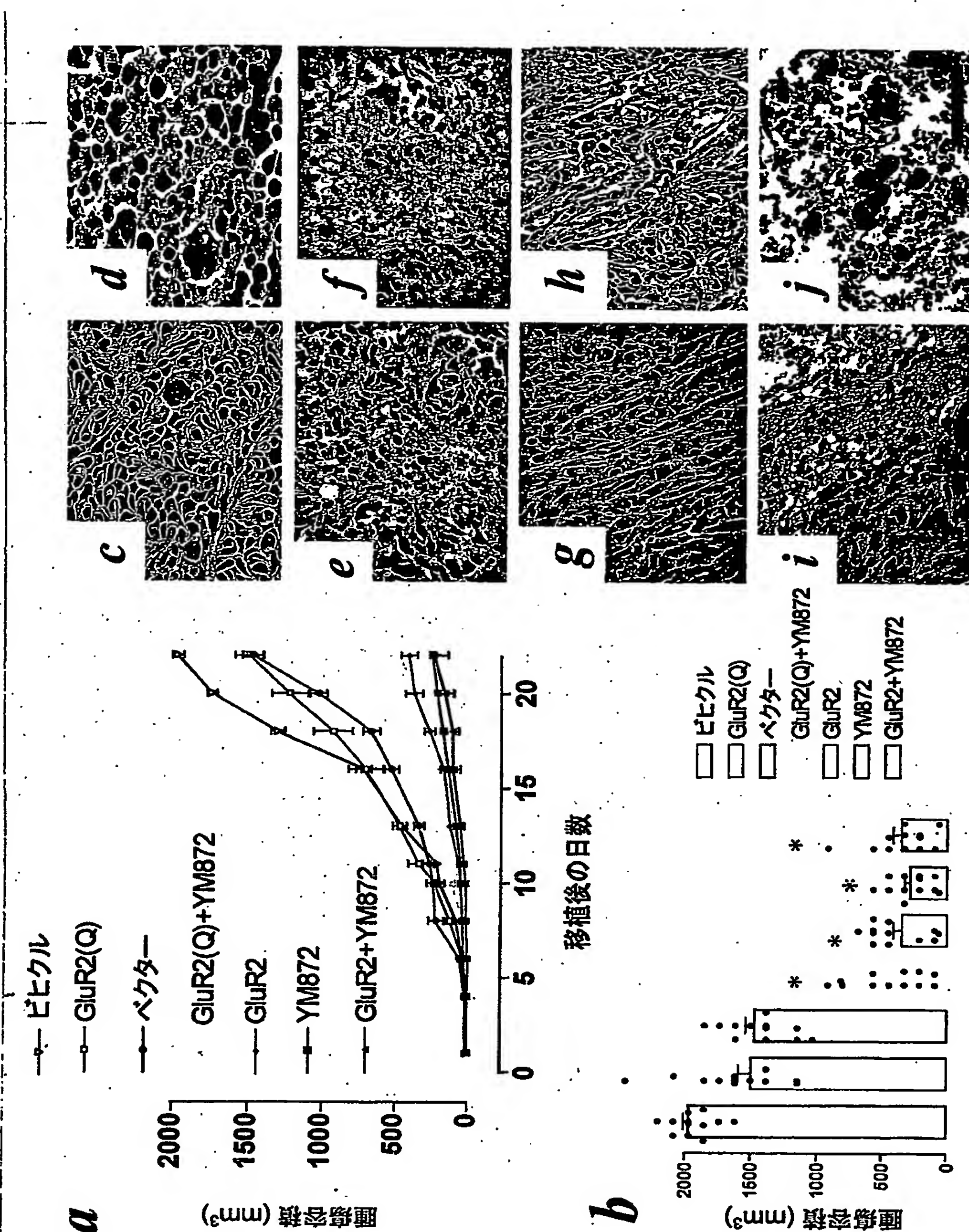
第 4 図



## 第 5 図



第 6 図



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Suppression of proliferation and infiltration of brain  
tumor cells by expression of glutamate receptor subunit

<130> A011-23PCT

<140>

<141>

<150>JP P2002-232086

<151>2002-08-08

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:1st PCR sense  
primer

<400> 1

cctttggcct atgagatctg gatgtg

26

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:1st PCR

antisense primer

<400> 2

tcgtaccacc atttgttttt ca

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:2nd PCR GluR1

sense primer



<400> 3

aagagggacg agaccagaca ac

22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:2nd PCR GluR2

sense primer

<400> 4

gaagatggaa gagaaacaca aagt

24

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:2nd PCR GluR3

sense primer

<400> 5

ggaagacaac aatgaagaac ctc

23

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:2nd PCR GluR4

sense primer

<400> 6

gaaggaccca gcgaccagcc

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10143

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 35/76, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 35/76, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS/CANCERLIT (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Rzeski W. et al., Glutamate antagonists limit tumor growth., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 22 May, 2001 (22.05.01); 98(11):6372-7.	7-9
A	Mass S. et al., Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 04 December, 2001 (04.12.01); 98(25):14687-92.	7-9
A	ISHIUCHI, S. et al., Extension of glial processes by activation of Ca <sup>2+</sup> -permeable AMPA receptor channels., Neuroreport., 26 March, 2001 (26.03.01); 12(4):745-8.	7-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October, 2003 (15.10.03)

Date of mailing of the international search report

28 October, 2003 (28.10.03)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10143

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-6, 10, 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10143

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

under the PCT, to search. Claims 10 and 11 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>7</sup> A61K48/00, 35/76, A61P35/00, 43/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>7</sup> A61K48/00, 35/76, A61P35/00, 43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS/CANCERLIT (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Rzeski W et al. Glutamate antagonists limit tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6372-7.	7-9
A	Maas S et al. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 4; 98(25):14687-92.	7-9
A	Ishiuchi S et al. Extension of glial processes by activation of Ca <sup>2+</sup> -permeable AMPA receptor channels. Neuroreport. 2001 Mar 26;12(4):745-8.	7-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 10. 03	国際調査報告の発送日 28.10.2003	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 川口 裕美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9829 印

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-6, 10, 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 1-6 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。  
請求の範囲 10, 11 は、人体の診断方法に関するものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**